

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ И ЛИОФИЛИЗАЦИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРОБИОТИКОВ

А.Е. Ананьина¹, И.П. Высеканцев², Т.М. Гурина³, И.Г. Гриша⁴

^{1,2,3,4}Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, 61016, Украина

Одним из приоритетных направлений современной биотехнологии является создание новых препаратов пробиотиков, используемых для эффективной коррекции дисбиозов, возникающих при воздействии на организм человека ряда отрицательных факторов [1, 4, 5, 9].

В последнее время особенную значимость приобрели препараты пробиотиков в различных защитных средах и иммобилизованные пробиотики [7, 8]. Иммобилизованные микроорганизмы позволяют значительно повысить выход биологически активных веществ в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), обладают непатогенностью, высокой антагонистической активностью, устойчивостью к ферментам ЖКТ, а также высоким уровнем адгезии к эпителию кишечника [8, 9].

Основными способами хранения коммерческих препаратов является хранение при низких температурах и лиофилизация [3, 6]. Влияние низкотемпературного хранения и лиофилизации пробиотиков, иммобилизованных в альгинатных гелях изучено недостаточно.

Целью исследования было сравнительное изучение влияния режимов охлаждения, процесса лиофилизации, состава консервирующих сред и условий хранения на жизнеспособность иммобилизованных в альгинатных носителях молочнокислых культур пробиотиков.

Объектом исследования были клетки культур *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus bulgaricus*, иммобилизованные в геле и гранулах 1% раствора альгината натрия.

Суспензию клеток культур *B. bifidum* и *L. bulgaricus* в различных средах (физиологический раствор, среда Блаурокка, сахарозо-молочно-лактозная среда (СМЛ) [2] и иммобилизованных в геле и гранулах 1% раствора альгината натрия замораживали со скоростью охлаждения 1,5,10,15 °С/мин до температуры -40 °С с последующим погружением в жидкий азот (-196 °С), также непосредственным погружением в жидкий азот (быстрая скорость охлаждения).

Было установлено, что жизнеспособность бактериальных культур зависит от скорости охлаждения и состава защитной среды [7, 8]. Наиболее высокая жизнеспособность бифидобактерий отмечалась в образцах, замороженных со скоростью 1 °С/мин. Даже при замораживании изолированных клеток культуры *B. bifidum* в физиологическом растворе их жизнеспособность составляла 79,7% от контроля. При замораживании образцов, иммобилизованных в 1% геле альгината натрия, охлаждение со скоростью 1 °С/мин обеспечивало сохранение исходного количества жизнеспособных клеток.

Анализ сохранности после замораживания клеток *L. bulgaricus* показал, что эти бактерии имеют другую чувствительность к изменению скорости охлаждения и составу защитных сред, включая 1% раствор альгината натрия. Данные бактерии обладали большей устойчивостью к повреждающим факторам процесса криоконсервирования [6, 3]. 100% жизнеспособность лактобактерий отмечалась в 1% растворе альгината натрия при охлаждении со скоростью 5 и 15 °С/мин, а также в защитной среде СМЛ при охлаждении со скоростью 10 °С/мин. Последующее хранение замороженных образцов пробиотических культур в жидком азоте при -196 °С обеспечивало максимальную сохранность жизнеспособности в течение 36 месяцев (срок наблюдения).

Одним из способов долгосрочного хранения бактериальных культур является лиофилизация [3]. Была проведена серия экспериментов по лиофилизации пробиотических культур *B. bifidum* и *L. bulgaricus*, иммобилизованных в 1% растворе альгината натрия с добавлением защитной среды СМЛ, с последующим хранением

лиофилизированных образцов при температуре 4, -12 и -20 °С.

Сразу после лиофилизации жизнеспособность иммобилизованной культуры *V. bifidum* составила 59,3% от контроля, процент жизнеспособных клеток культуры *L. bulgaricus* равнялся 53,9 по сравнению с контролем (титр клеток в экспериментальных образцах 10^{10} кл/мл). Остаточная влажность лиофилизированных микроорганизмов составляла 2,7 и 3,1%, соответственно. В период последующего хранения лиофилизированных образцов при температуре 4 °С жизнеспособность *V. bifidum* через 4 месяца составляла 6,9% по сравнению с данными, которые были получены сразу после лиофилизации (контроль). Увеличение срока хранения до 12 месяцев в этих условиях приводило к гибели бифидобактерий. При температуре -12 °С количество жизнеспособных бифидобактерий через 12 месяцев составило 7,9%, но после увеличения срока хранения в этих условиях клетки бифидобактерий погибали. В процессе хранения лиофилизированных образцов культуры *V. bifidum* при температуре -20 °С жизнеспособность оставалась на исходном уровне (контроль) в течение 4 месяцев. Через 12 месяцев хранения при -20 °С жизнеспособность бифидобактерий достоверно снижалась до 3,5% от контроля. Последующее хранение приводило к гибели клеток экспериментальных образцов.

В отличие от культуры *V. bifidum* лиофилизированная культура *L. bulgaricus* отличалась большей устойчивостью к действию условий хранения (4, -12 та -20 °С). На протяжении 4 месяцев хранения при температуре 4 °С жизнеспособность лактобактерий снижалась до 49,8% от контроля, через 12 месяцев – до 3,5%. При температуре -12 °С через 4 месяца хранения жизнеспособность лиофилизированных лактобактерий снижалась до 83,73%. Через 12 месяцев хранения в этих условиях жизнеспособность лиофилизированной культуры *L. bulgaricus* составляла 13,3% по сравнению с контролем. После хранения при -20 °С в течение 4 месяцев жизнеспособность лактобактерий не отличалась от контроля. Через 12 месяцев хранения при -20 °С жизнеспособность бактериальных образцов составляла 10,9% по сравнению с контрольными данными. После увеличения сроков хранения лиофилизированных образцов культура *L. bulgaricus* оставалась жизнеспособной, но титр клеток снижался на пять порядков. Увеличение сроков хранения приводило к гибели лиофилизированной культуры лактобактерий.

Литература

1. Воробьев А.А. Микробиологические нарушения при клинической патологии и их коррекция бифидосодержащими пробиотиками / А.А. Воробьев, В.М. Бондаренко, Е.А. Лыкова, А.В. Григорьев, Т.М. Мацулевич // Вестник РАМН. – 2004. № 2. – С.13–17.
2. Пат. №56674 Україна МПК С12N 1/04. Спосіб консервування культури *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 / Ананьїна Г.Є., Гольцев А.М., Висеканцев І.П. та ін. – Заявл.18.06.2010. Опубл. 25.01.2011. – Бюл. №2.
3. Похиленко В.Д. Методи длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 4 (12). – С. 99–121.
4. Токарева Н. Коррекция и профилактика дисбактериоза / Н.Токарева // Эффективная фармакотерапия. Гастроэнтерология. – 2011. – 3. – С.77–85.
5. Харченко Н. В. Микробиология кишечника и возможности коррекции ее нарушений / Н. В. Харченко, В. В. Черненко // Здоров'я України. – 2006. – № 21/1. – С. 54–55.
6. Цуцаева А.А. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов / А.А. Цуцаева, А.Е. Ананьина, Л.М.Балыбердина, Л.В. Степанюк, Н.В.Павленко // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 5. – С. 696–700.
7. Adhikari K. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage / K. Adhikari, A. Mustapha, IU Grün, L. Fernando // J Dairy Sci. – 2000. – Vol. 83, № 9. – P. 1946–1951.

8. [Sultana K.](#) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt / K. Sultana, G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, K. Kailasapathy // [Int J Food Microbiol.](#) – 2000. – Vol. 62, № 1-2. – P. 47–55.

9. Urdaci M.C., Bressollier P., Pinchuk I. Bacillus clausii probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities / M.C. Urdaci, P. Bressollier, I. Pinchuk, // J. Clin. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 38, № 6. – P. 86–90.